

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2002-522023  
(P2002-522023A)

(43)公表日 平成14年7月23日(2002.7.23)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
 C 12 N 15/09  
 A 01 H 5/00  
 C 12 N 5/10  
 9/24

識別記号  
ZNA

F I  
 A 01 H 5/00  
 C 12 N 9/24  
 15/00  
 5/00

テマコト<sup>\*</sup> (参考)  
 A 2 B 0 3 0  
 4 B 0 2 4  
 ZNAA 4 B 0 5 0  
 C 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全40頁)

(21)出願番号 特願2000-561327(P2000-561327)  
 (86) (22)出願日 平成11年7月23日(1999.7.23)  
 (85)翻訳文提出日 平成12年3月24日(2000.3.24)  
 (86)国際出願番号 PCT/US99/16579  
 (87)国際公開番号 WO00/05381  
 (87)国際公開日 平成12年2月3日(2000.2.3)  
 (31)優先権主張番号 09/122,533  
 (32)優先日 平成10年7月24日(1998.7.24)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), BR, CA, JP, MX, US

(71)出願人 カルジーン エルエルシー  
 アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア  
 州, デイヴィス, フィフス ストリート  
 1920  
 (72)発明者 スタルカー, デヴィッド, エム.  
 アメリカ合衆国 95695 カリフォルニア  
 州, ウッドランド, ダブリュ. サウスウッド 870  
 (72)発明者 ヒメル,マイケル,イー.  
 アメリカ合衆国 80123 コロラド州, リトルトン, ダブリュ. ハイアレア ブレイス 9202  
 (74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

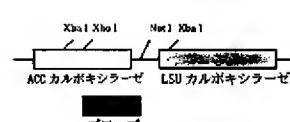
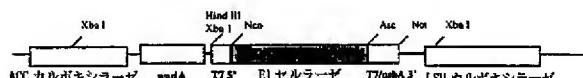
最終頁に続く

(54)【発明の名称】セルロース修飾に関連した酵素の発現

## (57)【要約】

植物または植物細胞におけるセルロース分解酵素の発現を提供するための植物細胞の遺伝子操作に有用な新規組成物及び方法。

pOGN6115のプラスミドマップ



プローブ

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 下記成分：

- (a) 植物細胞において機能するプロモーター、
- (b) ポリサッカライド加水分解酵素をコードするDNA配列、及び
- (c) 転写終結領域

を転写の5'から3'方向に機能的に連結して含む構築物。

【請求項2】 上記プロモーターが植物色素体内で機能することを特徴とする、請求項1に記載の構築物。

【請求項3】 細胞内オルガネラへの輸送を指令し得るターゲッティング配列を更に含むことを特徴とする、請求項1に記載の構築物。

【請求項4】 上記ターゲッティング配列が液胞への輸送を指令するものであることを特徴とする、請求項3に記載の構築物。

【請求項5】 上記ターゲッティング配列が色素体への輸送を指令するものであることを特徴とする、請求項3に記載の構築物。

【請求項6】 上記酵素が、約45°C、約55°C、及び約80°Cからなる群から選択される温度以上において活性であることを特徴とする、請求項1に記載の構築物。

【請求項7】 上記酵素が、セルラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、キシラナーゼ、リグニナーゼ及びヘミセルラーゼからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求項1に記載の構築物。

【請求項8】 上記酵素が、エンドセルラーゼ及びエキソセルラーゼからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求項1に記載の構築物。

【請求項9】 上記DNA配列が、CBH1、xynA、lacAL、lcc1、及びlccIVからなる群から選択される酵素をコードするものであることを特徴とする、請求項1に記載の構築物。

【請求項10】 請求項1に記載の構築物を含有する植物細胞。

【請求項11】 上記構築物が、上記細胞の核ゲノム中に組み込まれていることを特徴とする、請求項10に記載の植物細胞。

【請求項12】 上記構築物が、上記細胞の色素体のゲノム中に組み込まれ

ていることを特徴とする、請求項10に記載の植物細胞。

【請求項13】 請求項11に記載の植物細胞、及び請求項12に記載の植物細胞からなる群から選択される植物細胞を含む植物、植物種子または植物の部分。

【請求項14】 下記成分：

i) 植物細胞内で機能するプロモーター、

ii) ポリサッカライド加水分解酵素をコードするDNA配列、及び

iii) 転写終結領域

を転写の5'から3'方向に機能的に連結して含む構築物を含む植物を成長させ、そして

上記植物の細胞から上記酵素を単離する

段階を含む、ポリサッカライド加水分解酵素の製造方法。

【請求項15】 下記成分：

i) 植物細胞内で機能するプロモーター、

ii) 細胞壁成分を分解する酵素をコードするDNA配列、及び

iii) 転写終結領域

を転写の5'から3'方向に機能的に連結して含む構築物を含む植物を成長させ、そして

上記植物の細胞から上記酵素を単離する

段階を含む、熱最適性工業用酵素(heat optimal industrial enzyme)の製造方法。

【請求項16】 下記成分：

i) 植物細胞内で機能するプロモーター、

ii) ポリサッカライド加水分解酵素をコードするDNA配列、及び

iii) 転写終結領域

を転写の5'から3'方向に機能的に連結して含む構築物を含む植物を成長させる段階を含む、植物組織におけるセルロース含量を変える方法であって、上記植物の細胞内における上記酵素の発現のための条件下で上記植物を成長させることを特徴とする、上記方法。

【請求項17】 上記酵素が上記植物細胞のセルロースを分解し、上記セルロース含量を低減させるものであることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 上記植物細胞を含む植物材料(material)の消化率(digestability)が改善されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 上記プロモーターが植物色素体において機能するものであることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項20】 上記構築物が、細胞内オルガネラへの輸送を指令し得るターゲッティング配列を更に含むことを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項21】 上記ターゲッティング配列が、液胞への輸送を指令するものであることを特徴とする、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 上記ターゲッティング配列が、色素体への輸送を指令するものであることを特徴とする、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 上記植物細胞と混合される植物材料のセルロース含量が分解されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項24】 上記植物から植物材料を回収し、そして上記回収した植物材料を、上記酵素の活性が上昇して上記植物材料のセルロース含量が低減する条件下におく段階を更に含む、請求項16に記載の方法。

【請求項25】 上記酵素が、約45℃、約55℃、及び約80℃からなる群から選択される温度以上において活性であることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項26】 上記酵素が、セルラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、キシラナーゼ、リグニナーゼ及びヘミセルラーゼからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項27】 上記酵素が、エンドセルラーゼ及びエキソセルラーゼからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項28】 上記DNA配列が、CBH1、xynA、lacAL、lcc1、及びlccIVからなる群から選択される酵素をコードするものであることを特徴とする、請求項

16に記載の方法。

【請求項29】 下記成分：

- i) 植物細胞内で機能するプロモーター、
  - ii) 細胞壁成分を分解する酵素をコードするDNA配列、
  - iii) 転写終結領域、及び
  - iv) 細胞内オルガネラへの輸送を指令し得るターゲッティング配列
- を転写の5'から3'方向に機能的に連結して含む構築物を含む植物細胞を成長させる

段階を含む、植物細胞オルガネラにおける細胞壁成分を分解する酵素を包接する方法であって、上記植物細胞のオルガネラにおける上記酵素の発現のための条件下で上記植物細胞を成長させることを特徴とする、上記方法。

【請求項30】 上記ターゲッティング配列が、液胞への輸送を指令するものであることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 上記ターゲッティング配列が、色素体への輸送を指令するものであることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 上記植物細胞と混合される植物材料のセルロース含量が分解されることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項33】 上記植物細胞から植物材料を回収し、そして上記回収した植物材料を、上記酵素の活性が上昇して上記植物材料のセルロース含量が低減する条件下におく段階を更に含む、請求項29に記載の方法。

【請求項34】 上記酵素が、約45°C、約55°C、及び約80°Cからなる群から選択される温度以上において活性であることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項35】 上記酵素が、セルラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、キシラナーゼ、リグニナーゼ及びヘミセルラーゼからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項36】 上記酵素が、エンドセルラーゼ及びエキソセルラーゼからなる群から選択されるものであることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項37】 上記DNA配列が、CBH1、xynA、lacAL、lcc1、及びlccIVからなる群から選択される酵素をコードするものであることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本出願は1998年7月24日出願の特許出願第09/122,533号の一部継続出願である。

。

**【0002】****(技術分野)**

本発明は植物への遺伝子工学技術の適用に関するものである。さらに詳細には、本発明は植物色素体の中でポリサッカライド加水分解酵素（セルラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、キシラナーゼ、ヘミセルラーゼ）の発現のための組成物と方法に関するものである。

**【0003】****(技術背景)**

ポリサッカライド加水分解酵素は、共に働いてセルロースを単純な糖成分に分解する酵素ファミリーである。また、セルロースは工業的には酵素で分解される場合よりもはるかに厳しい条件を用いて酸加水分解によって分解される。さらに、ポリサッカライド加水分解酵素は特異的生成物を産生する極めて特異的な反応を触媒し、また、酸加水分解反応と比べて極めて少量しか必要ではない。

**【0004】**

セルロース分解酵素は広く様々な工業的適用に使われている。それら酵素の主要な潜在的使用の一つは、セルロース性バイオマスの工業上重要な最終産物（例えば、発酵して様々な産物を生じることのできる糖）への転換においてである。例えば、燃料の製造において、エタノールはトウモロコシ等の穀物から製造できる。セルロース含有量の高い稲の藁を利用する同様の過程は現在開発中である。あいにく、このような方法で製造されたエタノールはガソリンと商業的に競争するにはまだ高値すぎる。しかしながら、木材、芝及び他の高セルロース含有バイオマスをエタノール製造に利用する技術の進歩は、安価でクリーンな燃料原料製造分野にとって貴重なものであろう。

**【0005】**

バイオマスの転換に加え、セルロース分解酵素は以下を含む様々な他の産業製

品や加工における有用性がある：織物の仕上げ、洗剤の添加物の製造、食品や飲料の加工、食品添加物、サイロでの貯蔵と発酵。

#### 【0006】

セルロース分解酵素産生における現在の方法は、一般に、リグノセルロースエタノール産業の更なる発達に制限されると考えられている。糸状菌は、工業用セルラーゼの产生で知られている。しかしながら、セルロース分解酵素の経済的な产生は、相対的に遅い増殖率のセルロース分解酵素产生菌による合成であり、酵素の高いエタノール产生価誘導には長時間を要する。

#### 【0007】

近年、セルロース分解酵素をコードする遺伝子が種々のセルロース分解性の細菌及び真菌類からクローニングされた。クローニングされたセルラーゼをコードする遺伝子は高い熱安定性に加え、幅広いpH域での高い特異的活性を有しており、生物エタノールを得る工程に最も望ましいと考えられる。

#### 【0008】

セルロース分解酵素を生成する組換え細菌または真菌類宿主は、様々なセルラーゼ調製品を生成するための最近の努力の焦点であった。しかしながら、植物細胞中のポリサッカライド分解酵素の产生方法が必要である。こうした方法は安価でかつ豊富な量のセルロース分解酵素の原料を提供することになるだろう。

#### 【0009】

##### (発明の概要)

本発明は植物細胞内のポリサッカライド加水分解酵素の製造のための方法及び組成物を提供する。本方法は一般的に、植物の形質転換のためのプロモーター、ポリサッカライド加水分解酵素をコードする核酸配列及び転写終結領域を有する発現構築物の使用を含む。好ましくは、このプロモーターは植物細胞の色素体の中で機能する。

#### 【0010】

本発明により、ポリサッカライド加水分解酵素をコードする構築物が植物細胞内で生産され得る方法を開示する。本発明のある態様では、植物色素体内でのポリサッカライド加水分解酵素の高レベルの発現方法を開示する。

### 【0011】

植物細胞内におけるポリサッカライド加水分解酵素の高レベルの発現を提供する本方法は、植物細胞におけるセルロース分解酵素（セルラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、キシラナーゼ、ヘミセルラーゼ）の製造のための新規な手段を提供する。本方法は一般に、植物細胞内で機能する転写開始領域、ポリサッカライド加水分解酵素をコードするDNA配列及び転写終結配列を転写の5'から3'方向に機能的に連結した成分として含む構築物を自己のゲノムに組み込まれた植物を生長させることを含む。

### 【0012】

#### (発明の詳細な説明)

発明の主題に従って、色素体発現構築物を提供するが、これは一般に、植物細胞において機能するプロモーター、ポリサッカライド加水分解酵素をコードするDNA配列、及び植物細胞において転写を終結し得る転写終結領域を含む。これらの要素は転写の5'から3'方向に機能的に連結した成分として提供される。

### 【0013】

本発明のポリサッカライド加水分解酵素は、どんな原料からでも獲得し得る。本発明のポリサッカライド加水分解酵素は、好ましくは非植物原料から獲得される。好ましくは、ポリサッカライド加水分解酵素はセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びリグニナーゼである。

### 【0014】

ポリサッカライド加水分解酵素はセルロースを単純な糖構成単位に分解する酵素のファミリーである。そのファミリーは様々な種類の酵素を含み、これにはセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びリグニナーゼがあるが、それらに限定されるものではない。

### 【0015】

本明細書で使用するポリサッカライドとは、約10個より多いモノサッカライド残基がグリコシド結合して分枝もしくは非分枝鎖をなすポリマーをいう。モノサッカライドとは、より小さい単位に加水分解することができない单糖をいう。実験式は  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  でサイズはトリオース ( $n=3$ ) からヘプトース ( $n=7$ ) に

及ぶ。

### 【0016】

本明細書で使用するセルラーゼ酵素にはエンドセルラーゼおよびエキソセルラーゼがあるが、それらに限定されるものではない。エンドセルラーゼには、例えば、アシドサーマス・セルロリティカス (*Acidothermus cellulolyticus*) 由来のE1セルラーゼ（米国特許第5,536,655号に記載）のような酵素がある。エキソセルラーゼには、例えば、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 由来のセロビオヒドロラーゼ1 (CBH1) (Shoemakerら, (1983) *Biotechnology*, 1:69 1-696) のような酵素がある。

### 【0017】

本明細書で使用するヘミセルラーゼにはキシラナーゼがあるが、それに限定されるものではない。キシラナーゼをコードする核酸配列は当技術分野で知られており、アシドバクテリウム・カプスラートウム (*Acidobacterium capsulatum*) 由来のxynA (Inagakiら, (1998) *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 62 (6):1061-1067) 及びクロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*) 由来のxynA (Hayashiら, (1999), *Appl.Microbiol.Biotech.*, 51 (3):348-357) を含む。

### 【0018】

本明細書で使用するリグニナーゼにはラッカーゼがあるが、それに限定されるものではない。本発明の方法において使われる核酸配列には、それらに限定されるものではないが、シゾフィラム・コムーネ (*Schizophyllum commune*) 由来のlaccAL (Hatamotoら, (1999) *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 63(1):58-64) 、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来のlcc1 (Jonssonら, (1997) *Curr Genet*, 32(6):425-530) 、そしてトラメテス・ベルジコロル (*Trametes versicolor*) 由来のlccI及びlccIV (Ongら, (1997) *Gene* 196 (1-2):113-119) を含む。

### 【0019】

本発明のある態様では、発現構築物を、植物細胞においてポリサッカライド加水分解酵素の発現を指令するよう調製する。一般に、構築物は植物細胞において機能するプロモーター、ポリサッカライド加水分解酵素をコードする核酸配列及び植物細胞において機能する転写終結領域を含む。

### 【0020】

本発明の構築物で用いられるプロモーターは、植物細胞の核内で機能するプロモーターあるいは植物細胞のミトコンドリア及び色素体といったオルガネラ中で機能するプロモーターを含む。当業者に認められるように、植物細胞において機能的である多くのプロモーターが存在し、文献に記載されている。また、葉緑体及び色素体特異的プロモーター、葉緑体もしくは色素体機能性 (functional) プロモーター、そして葉緑体もしくは色素体機能的 (operable) プロモーターも考えられる。

### 【0021】

一組のプロモーターはほとんどの植物器官の中で高レベルの発現を起こすCaMV 35SもしくはFMV 35Sプロモーターのような構成的プロモーターである。CaMV 35S及びFMV 35Sプロモーターの促進もしくは複製型は本発明の実施において有用である (Odeillら, (1985) *Nature* 313:810-812; Rogers, 米国特許第5,378,619号)。更に、植物の特定の組織（例えば葉、茎、根、塊茎、種子、果実など）においてセルロース分解酵素の発現を引き起こすことも好ましく、選択されるプロモーターは所望の組織及び発生の特異性を持つべきである。

### 【0022】

特定の細胞下コンパートメント、例えばミトコンドリア、小胞体、液胞、葉緑体もしくは他の色素体コンパートメントへのポリサッカライド分解酵素の局在化を指令することは有利でありうる。例えば、本発明の目的の遺伝子が、発現のために葉緑体のような色素体にターゲッティングされる場合には、構築物にも遺伝子を色素体へ向けるような配列を使用する。そのような配列をここでは葉緑体輸送ペプチド (CTP) もしくは色素体輸送ペプチド (PTP) という。このように、目的の遺伝子が色素体に直接挿入されない場合、発現構築物は目的の遺伝子を色素体に向ける輸送ペプチドをコードする遺伝子を更に含む。葉緑体輸送ペプチドは、目的の遺伝子に由来するものであっても、またはCTPを含有する異種の配列に由来するものであってもよい。そのような輸送ペプチドは当技術分野で知られている。例えば、下記の文献を参照すること。Von Heijneら, (1991) *Plant Mol. Biol.* Rep. 9:104-126; Clarkら, (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; del

la-Cioppaら, (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romerら, (1993) *Biochem. Biophys. Res Commun.* 196:1414-1421; 及びShahら, (1986) *Science* 233:478-481。小胞体(ER)もしくは液胞へのタンパク質の転位のための更なる輸送ペプチドも、本発明の構築物中で使用しうる。

#### 【0023】

好ましくは、本発明の構築物において用いられるプロモーターは、植物細胞色素体において機能する。色素体において機能する多くのプロモーターが当技術分野で知られており、以下のものがあるが、それらに限定されるものではない：16S rRNAプロモーター領域、Prrn (Svabら, (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:913-917) 及びD1チラコイド膜タンパク質プロモーター領域、PpsbA (Staubら, (1993), *EMBO J.*, 12(2):601-606)。

#### 【0024】

好ましくは、本発明の構築物に使用される転写終結領域は、植物細胞色素体において機能する。多くのそのような終結領域が当技術分野で入手でき、D1チラコイド膜タンパク質終結領域、TpsbA (Staubら, (1993), *EMBO J.*, 12(2):601-606) があるが、これに限定されるものではない。

#### 【0025】

本明細書に記載される実施例において、アシドサーマス・セルロリティカス由来の好熱性E1セルラーゼをコードする核酸配列、並びにセロビオヒドロラーゼI (CBH I)、ラッカーゼ及びキシラナーゼをコードする配列を、植物細胞の色素体からの発現を指令するための構築物に使用する。さらにE1セルラーゼを発現するトランスペラストミック (transplastomic) タバコ植物はセルラーゼ酵素の高レベルの発現を示す。

#### 【0026】

加えて、発現した酵素は抽出した野生型酵素と同様の酵素特性を示す。例えば、以下に示す実施例において、ホモプラスマミック (homoplasmonic) タバコ植物から発現したセルラーゼを含んでいる粗タンパク抽出物は55°Cより80°Cにおいてより高い活性を示す。このように本発明において記載されるように植物色素体から発現させた好熱性セルラーゼは、83°Cの至適温度を有する野生型セルラー

ゼと同様の好熱性特性を示す（米国特許第5,536,655号に記載、参照によりその全体を本明細書に組み入れる）。45°Cを上回る温度で増加した活性を有する好熱性セルラーゼは、製造分野において形質転換された植物の培養の際、セルラーゼ活性に対する保護手段となる。好ましくは、セルラーゼは55°C付近かそれ以上で最適な活性を有する。

### 【0027】

本発明が属する技術分野に精通する者に認識されるように、他種由来酵素が本発明の色素体発現構築物において利用されてもよい。例えば、サーモモノスボラ・フスカ (*Thermomonospora fusca*) 由来のもののような他のポリサッカライド加水分解酵素をコードするDNA配列（例えばWilson (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:45-63を参照）を本発明の発現構築物において使用してもよい。

### 【0028】

本発明の構築物を宿主植物細胞の核ゲノムに組み込んでもよく、酵素は、細胞内オルガネラにターゲッティングされる。例えば、発現された酵素を液胞に向ける配列、並びに色素体への輸送を指令する配列を使用してもよい。そのような色素体輸送ペプチドは当技術分野で知られている。例えば、Von Heijneら, (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clarkら, (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; della-Cioppaら, (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romerら, (1993) *Biochem. Biophys. Res Commun.* 196:1414-1421; 及びShahら, (1986) *Science* 233:478-481を参考すること。液胞へのターゲッティングのためのタンパク質シグナルは、トマト由来のメタロカルボキシペプチダーゼ阻害遺伝子のN末端領域の32アミノ酸のように、粗面小胞体を通じて通常輸送される植物遺伝子から得ることができる (Martineauら, (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228:281-286)。シグナル配列に加えて、液胞ターゲッティング構築物は、コードされたタンパク質のカルボキシ末端に配置された液胞局在化シグナル (VLS) をもコードする。適切なシグナル配列とVLS領域は様々な他の植物遺伝子から得ることができ、そして本発明の構築物において同様に使用できる。非常に多くの液胞ターゲッティングペプチドが当技術分野で知られており、Chrispeelsら, *Cell* (1992) 68:613-616にも概説されている。

## 【0029】

構築物の開発において、調節領域とオープンリーディングフレームを含む様々な断片に、ライゲーション、制限酵素消化、PCR、酵素改善のためのin vitro変異誘発、リンカー及びアダプター付加などのような異なったプロセシング条件を施与してもよい。従って、ヌクレオチド転移(transition)、転換(transversion)、挿入、欠失などを、色素体において発現させるための調節領域において使用されるDNAまたは目的のDNA配列に対して行うことができる。制限酵素消化、クレノウ・プラント末端処理、ライゲーションなどの方法は当業者に良く知られており、例えばManiatisらによって記載されている(分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。

## 【0030】

構築物の調製の間、多くの場合、様々なDNA断片を好適なクローニングベクターにクローニングし、それによって、配列、リンカーなどの連結もしくは除去によるDNAの增幅、DNA修飾、またはDNAの操作が可能となる。好ましくは、ベクターはE. coliにおいて少なくとも比較的高いコピー数に複製可能なものである。pBR322のようなベクター、pUCシリーズのベクター、M13シリーズのベクター及びpBluescriptベクター(Stratagene; La Jolla, CA)を含む多くのベクターが、クローニングのために容易に入手できる。

## 【0031】

所望の植物細胞の選択手段を提供する目的で、色素体の形質転換のためのベクターは一般的に、選択可能なマーカー遺伝子発現のために提供される構築物を含む。マーカー遺伝子は、選択的基質を減衰させるか、もしくは不活性化させる、すなわち抗生物質、除草剤などによる天然の阻害に打ち勝つポリペプチドを発現する、植物で発現できるDNA配列である。

## 【0032】

あるいはまた、マーカー遺伝子は他の目に見える応答をするものであってよい。すなわち、ある基質の存在下で選択可能なマーカー遺伝子を発現しない植物もしくは植物細胞に比較して特有の外観または生長パターンを誘引するものであ

ってもよく、植物もしくは植物細胞に直接適用されるか、または植物もしくは植物細胞生長培地中に存在するかのいずれでもよい。

#### 【0033】

いずれにせよ、そのような選択可能なマーカー遺伝子を含んでいる植物もしくは植物細胞は、同定目的のための特有の表現型を持つ。すなわち、それらは形質転換されていない細胞から識別される。特有な表現型により、構築物を含む細胞、細胞群、組織、器官、植物器官もしくは植物全体の同定が可能となる。

#### 【0034】

マーカーの表現型を検出することにより、マーカー遺伝子が物理的に結合した第2の遺伝子を有する細胞の選択が可能となる。この第2の遺伝子は一般的に好ましい表現型を含有し、これは形質転換された細胞において容易に同定はされないが、植物細胞もしくはその誘導体が増殖して成熟する際に、選択可能なマーカーの表現型そのものが表出しないような条件下でさえも、存在する。

#### 【0035】

色素体構築物を含む植物細胞の同定のためのそのようなマーカーの使用は、Svabら(1993, 上記)によって記載されている。下記に提供される実施例では、細菌性aadA遺伝子は葉緑体5'プロモーター及び3'転写終結領域、特にthepsbA遺伝子の調節領域の調節制御下でマーカーとして発現される。(Staubらによつて記載された(1993, 上記))。非常に多くの異なるプロモーター領域を使用して、植物色素体において機能することが示されている様々な色素体プロモーターと細菌性プロモーターを含む選択可能なマーカー遺伝子の発現をさせることもできる。

#### 【0036】

aadA遺伝子の発現は、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を授与し、そしてそれによってこのマーカーを発現する植物細胞の同定が可能となる。aadA遺伝子産物により、葉緑体が選択可能なマーカー遺伝子産物を生成するような細胞は持続的に増殖して緑色となる。選択可能なマーカー遺伝子産物を含まない細胞は白くなる。aadA遺伝子マーカーの選択は、植物生長培地においてストレプトマイシン、もしくはより好ましくはスペクチノマイシンの存在によって白く

ならない植物細胞の同定に基づいて行う。

#### 【0037】

多くのマーカーは、クロラムフェニコール、アミノグリコシドG418、ハイグロマイシンなどに対する耐性のような植物細胞で使用するために開発されてきた。葉緑体代謝に関与する生成物をコードする他の遺伝子を選択可能なマーカーとしても用いることもできる。例えば、グリホサート、プロモキシニルもしくはイミダゾリノンのような植物除草剤に対する耐性を与える遺伝子は特定の用途を見いだしうる。そのような遺伝子は報告されてきた (Stalkerら, J. Biol. Chem. (1985) 260:4724-4728 (グリホサート耐性EPSP) ; Stalkerら, J. Biol. Chem. (1985) 263:6310-6314 (プロモキシニル耐性ニトリラーゼ遺伝子) ; 及びSathasivanら, Nucl. Acids Res. (1990) 18:2188 (AHAS イミダゾリノン耐性遺伝子) )。

#### 【0038】

biolistic 法もしくは衝撃 (bombardment) 法を使用して植物細胞へ標的DNA構築物を移入するための植物の核の形質転換及び選択の方法を本発明において使用することもできる。そのような方法は、アグロバクテリウム媒介形質転換法に対する感受性がより低い植物細胞の形質転換において、特に有用である。衝撃形質転換法はSanfordら, (1991) Technique 3:3-16; Kleinら, (1992) Bio/Technology 10:286-291に記載されている。

#### 【0039】

一般に、植物細胞の形質転換において、標的外植片を、例えばHorschら (Science (1985) 227:1229-1232) に記載されるように形質転換されたアグロバクテリウムとともに培養するか、もしくはDNAを被覆した粒子を撃ち込む。次いで植物細胞を好適な培地で生長させ、所望の構築物を獲得したそれらの植物細胞を選択的に培養する。カルスを形成すれば、良く知られた方法に従って適切な植物ホルモンを用いることによって苗条形成を促進し、植物再生のために発根培地に苗条を移す。植物はそれから成長することができ、形質転換した同じ系統か異なった系統と受粉可能である。ホモ接合型系列の生成には、自家受粉が用いられる。

#### 【0040】

粒子衝撃法によるタバコ色素体ゲノムの安定した形質転換が報告されている（Svabら, (1990) (上記) 及びSvabら, (1993) (上記)）。その中に記載された方法を、色素体発現構築物に関してホモプラスミーである植物を得るために用いてよい。

#### 【0041】

一般に、粒子を撃ち込んだ組織を細胞分裂を促進する培地で約2日間培養し、その後、植物組織を特定の植物種に再生するのに必要な他の基質及び特定のホルモン、及び特定の選択試薬を阻害量含む選択培地に移す。次いで、苗条を同じ選択培地で継代培養し、ホモプラスミーの苗条の生成及び選択を確実にする。

#### 【0042】

ホモプラスミーを、目的のタンパク質をコードする遺伝子に関するトランスペラストミック (transplastomic) 植物にサザンプロット法による解析を行うことによって確認する。下記に提供した実施例において、*Xba* Iで消化した総細胞内DNAを放射性標識プローブ、具体的にはマーカー遺伝子を含む色素体ターゲッティング断片の一部分及びアセチルCoAカルボキシラーゼDNA配列を含む組込み領域の配列で分析する。このプローブを用いるサザンプロット分析によって、タバコ色素体ゲノム内にキメラE1セルラーゼ遺伝子が組込まれ、トランスクリプトーム系列が生成していることが確認される。

#### 【0043】

アグロバクテリウム介在型形質転換、粒子衝撃、または他の方法による形質転換及び再生の方法が所定の植物種に適合された場合、確立された技術を修飾して選択及び再生の方法に使用し、色素体が形質転換された植物を生成してもよい。例えば、本明細書中に記載されたタバコ用の方法は、トマト、ペチュニア及びじやがいものような他のナス科に属する種に容易に適用できる。

#### 【0044】

大豆及び他の植物種の形質転換のための粒子衝撃、並びにアグロバクテリウム介在型核形質転換及び再生のプロトコールは、次に記載されている (Hincheeら, 米国特許第5,416,011号及びChristouら, 米国特許第5,015,580号)。当業者に認識されるように、大豆形質転換のために記載されたプロトコールを他の植物に

使用及び適合させることができる。

#### 【0045】

アブラナ属では、アグロバクテリウム介在型形質転換及び再生のプロトコールは、一般に、胚軸組織、色素体含有量の低い非緑色組織の使用を含む。このようにアブラナ属では、好ましい標的組織には小胞子由来の胚軸もしくは子葉組織（緑色であり、従って多数の色素体を含有する）、または葉組織外植片が挙げられる。そのような組織からの再生率は低いかもしれないが、アグロバクテリウム介在型形質転換に見られるような位置的影響は予期されず、従って所望の表現型を得るために、多くの上手く形質転換した植物をスクリーニングすることは必要ない。

#### 【0046】

綿の場合、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) との共培養によるゴッショウム・ヒルスタム (*Gossypium hirsutum*) L. 子葉の形質転換はFiroozabadyら, Plant Mol. Bio. (1987) 10:105-116及びUmbeckら, Bio/Technology (1987) 5:263-266に記載されている。この場合もアブラナ属に関する限り、この組織は葉緑体の形質転換に十分な量の色素体を含有しない。従って、アブラナ属に関する限り、葉緑体を含む代替の標的組織の形質転換及び再生のための代替の方法が好ましく、例えば、ターゲッティング緑色胚発生組織をターゲッティングする。

#### 【0047】

他の植物種を関連技術を用いて同様に形質転換してもよい。あるいはまた、Kleinら (Bio/Technology 10:286-291) によって記載されたようなマイクロプロジェクトタイル (microprojectile) 衝撃法を、本明細書中に記載したウイルス性1本鎖単一サブユニットRNAポリメラーゼ発現構築物を含む核形質転換植物を得るために使用してもよい。粒子衝撃による綿の形質転換は国際公開WO 92/15675 (1992年9月17日発行) において報告されている。本発明の実施対象植物には、限定されないが、大豆、綿、アルファルファ、油料ナタネ種子(oil seed rape)、亜麻、トマト、サトウダイコン、ヒマワリ、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、小麦、米及びレタスがある。

### 【0048】

トウモロコシ、小麦、及び米の形質転換法は、当技術分野で周知である。そして、例えば米国特許第5,538,877号及び第5,538,880号、米国特許第5,610,042号及びヨーロッパ特許EP 539563号に記載されている。

### 【0049】

色素体形質転換において使用されるベクターは、好ましくは色素体ゲノムへの色素体発現構築物及び選択可能なマーカー構築物の安定した移入をもたらすための手段を含む。これは、標的色素体ゲノムに相同な領域によって最も都合良くもたらされる。相同領域は移入される構築物に隣接し、ゲノムへの二重交差を経て相同的組換えによって色素体ゲノムへの移入を生じさせる。タバコ色素体ゲノムの完全なDNA配列が報告されている(Shinozakiら, EMB0 J.(1986) 5:2043-2049)。Liverwort(Ohyamaら, Nature (1986) 322:572-574)及び米(Hiratsukaら, Mol. Gen. Genet. (1989) 217:185-194)由来の色素体ゲノムの完全なDNA配列もまた報告されている。

### 【0050】

相同領域が色素体ゲノムの逆方向反復領域(IRA及びIRBとして知られている)中に存在する場合、形質転換した色素体あたり二つのトランスジーンのコピーが見込まれる。色素体ゲノム内での相同領域は約1kbのサイズである。より小さい相同領域も使うことができる。そして100bpという小ささで、色素体ゲノム中へ相同的組換えをもたらすことができる。しかし、組換えの頻度、ひいては形質転換された色素体をもつ植物が得られる頻度は、相同領域のサイズの低下とともに低下する。

### 【0051】

色素体ゲノム由来の相同領域をもつ構築物の例は以下において記載されている。Svabら(1990(上記)), Svabら(1993(上記))及びZoubenkoら(Nuc Acid Res (1994) 22(19):3819-3824)。ここで提供する実施例では、色素体発現構築物に隣接するタバコ色素体相同領域は、アセチルCoAカルボキシラーゼ(ORF 5 1 2)とRuBisCo(rbcL)の大きなサブユニットの間のタバコ葉緑体ゲノムへのE1セルラーゼトランスジーンの挿入を指令する。そのような相同領域はSvab及びMa

liga (1993) (上記)において記載されている。色素体ゲノムへの組込みは相同的組換によって起こり、標的部位は色素体ゲノムの逆方向反復領域中にはないために、色素体ゲノムにつき一つのトランスジーンのコピーが見込まれる。選択は、aadA遺伝子によって発現したスペクチノマイシン耐性マーカー表現型に関して行う。

#### 【0052】

植物の主な成分の一つがセルロースであるが故に、植物細胞中のセルロース分解酵素産生は宿主生物へ有害な影響を及ぼし得るものと予測される。しかし、植物オルガネラにおいて発現したセルロース分解酵素を区分することによって、例えば色素体において、セルラーゼ酵素発現のどんな有害な影響も克服されうる。さらに、高温及び／又は最適pHでのセルロース分解酵素の利用は、周囲温度で生長した植物中のそのような酵素の発現に対する防護策ともなりうる。

#### 【0053】

植物色素体（葉緑体、アミロプラスト、エライオプラスト、有色体など）は光合成に加えて、アミノ酸、複合糖質、脂肪酸及び色素のような産業的に重要な化合物の生成を担う、主要な生合成中枢である。色素体は原色素体として知られる共通の前駆体から誘導され、従って、所定の植物種中に存在する色素体は全て同じ遺伝内容を持つ。植物細胞は小さい120～160kbの環状ゲノムのコピーを500～10,000含有し、そのそれぞれの分子は大きな（約25kb）逆方向反復を持つ。従って、植物細胞を操作して、特定の興味の遺伝子のコピーを20,000まで含有するようにすることができるが、これによって非常に高レベルの外来遺伝子発現を誘引することができうる。加えて、ほとんどの植物の色素体は母方から遺伝する。従って、色素体中に発現された異種遺伝子は花粉によって散布されることがない。ゆえに、植物色素体に導入された特性は他家受粉によって同じ系統の野生型に伝達されることはない。このように、高等植物の色素体は、遺伝子工学では魅力的な標的である。

#### 【0054】

本発明はまた、宿主植物細胞における熱安定性工業用酵素の產生法を提供する。そのような方法は一般に、トランスジェニック植物の製造における本発明の發

現構築物の使用を含む。好ましくは、本方法は熱安定性ポリサッカライド分解酵素の植物細胞における発現、形質転換された細胞を有する植物の生育、植物または植物の一部の回収、そして回収した植物材料への最適化された酵素活性を促進する条件の施与を含む。

#### 【0055】

本発明はさらに、オルガネラ（例えば液胞、色素体など）において細胞壁分解酵素を包接するための方法を提供する。その方法は一般的に、植物細胞核におけるポリサッカライド分解酵素の発現、及びオルガネラ（organellar）ターゲッティング配列を使用した植物細胞オルガネラにおける酵素の局在化を含む。あるいはまた、酵素は、例えば植物細胞色素体のような植物細胞オルガネラから直接発現することができる。

#### 【0056】

本発明の方法は、植物細胞におけるポリサッカライドの修飾に関する更なる配列及び構築物を含むこともできる。そのような配列と構築物は、当技術分野で公知であり、PCT国際公開W098/18949に記載されるものがあるが、それに限定されず、その全体は参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0057】

本発明の方法はポリサッカライド分解酵素をコードする一つ以上の配列の発現をもたらす一つ以上の発現構築物の発現を含むこともできる。例えば、一つの発現カセットを植物細胞に導入してエンドセルラーゼを発現させることができ、そして第2の発現カセットもまたリグニナーゼの発現のために導入することができる。

#### 【0058】

このように本発明は植物細胞における好熱性ポリサッカライド加水分解酵素（すなわち、セロビオヒドロラーゼ、キシラナーゼ、ヘミセルラーゼ）の新規製造方法を提供する。植物細胞におけるそのような酵素の発現により、工業製品／加工（例えば織物の仕上げ、洗浄剤、食品及び飲料の加工、食品添加物、サイロでの貯蔵、パルプ化、製紙及びバイオマス転換）に利用されるポリサッカライド分解酵素を製造するための代替原料が提供される。そして、植物色素体における好

熱性セルラーゼ及びその関連セルロース分解酵素の発現により、植物組織中に含まれた内因性セルロースを分解し、貯蔵された炭素（モノサッカライドとして）をそれに続く発酵過程のために遊離するための代替となる、または補足的な方法を提供する。更に、酵素の分離（基質からの単離）及び／または好熱セルロースの高温最適性（周囲温度での低活性に比較して）によって、重要な植物の生長および発育段階の際に植物を固有の酵素活性から守る二つの内部防護策が提供される。

### 【0059】

本発明について一般的に記載したが、以下の実施例を参照することにより、更に容易に理解されるであろう。それらの実施例は単に説明のためのものであり、本発明を制限するものではない。

### 【0060】

#### (実施例)

##### (実施例1) 構築物の調製

高等植物の色素体の形質転換に使用するための構築物及び方法はZoubenkoら (Nuc Acid Res (1994) 22 (19):3819-3824)、Svabら (Proc. Natl. Acad. Sci. (1990) 87:8526-8530) および Proc. Natl. Acad. Sci. (1993) 90:913-917)、及び Staubら (EMBO J. (1993) 12:601-606) に記載されている。タバコの色素体ゲノムの完全なDNA配列はShinozakiら (EMBO J. (1986) 5:2043-2049) によって報告されている。以下の記述における全ての色素体DNAの表示 (references) はタバコからのヌクレオチド番号に対するものである。

### 【0061】

ベクターを調製して、植物色素体においてアシドサーマス (Acidothermus) E1  $\beta$ -1, 4-エンドグルカナーゼの発現を指令させた。プラスミド pMPT 4 はアシドサーマス E1 セルラーゼコード配列全体 (米国特許第5,536,655号) および フランкиング領域を 3.7 kb Pvu I ゲノムDNA断片に含有する pGEM (Clonetech社) 誘導体であるが、これを制限エンドヌクレアーゼ部位 SacII および Asp718 で消化し、成熟した E1 セルラーゼタンパク質のコード配列を除去した。この断片をプラスミド pBCSK+ (Stratagene社) の同じ制限部位にクローニングし、ベクター pCGN

6063を作製した。このプラスミドをSacIおよびSacIIで消化し、二本鎖オリゴヌクレオチド配列、5'-GGAGCTGCGTCACCATGGCGGA-3'を挿入して、E1 $\beta$ -1, 4-エンドグルカナーゼポリペプチドの60,000 mol wtの成熟配列（内因性細菌シグナルペプチドアミノ酸配列を除いたもの）に融合したNcoI部位由來のATG翻訳開始コドンを導入し、構築物pCGN6067を作製した。E1遺伝子をNcoIからAscIのDNAセグメントとしてpCGN6067から切り出し、T7プロモーター発現カセットpCGN5063にクローニングして構築物pCGN6108を作製した。このプラスミドは、E1コード配列の成熟タンパク質部分及びpsbA転写終結領域に機能的に連結したT7バクテリオファージプロモーターの色素体発現調節エレメントを含有する。キメラのセルラーゼ発現カセットを HindIII からNotI のDNA断片として切り出し、タバコ葉緑体相同ベクター pCGN6043 の同じ制限部位にクローニングし、構築物 pCGN6115 を作製した。ベクターに使用される相同配列は、E1セルラーゼ遺伝子及びaadAマーカー・トランスジーンの、rbcL 及びORF512配列の間の領域への組込みを指令する (Svabら (1993) (上記) に記載)。構築物 pCGN6115 (図1) を使用してタバコ植物を形質転換し、ホモプラスミーへの形質転換及び植物色素体における E1 $\beta$ -1, 4-エンドグルカナーゼをコードする遺伝子の色素体発現を指令させた。

### 【0062】

ディクチオグロムス・テルモフィラム (*Dictyoglomus thermophilum*) 由來のキシラナーゼをコードする核酸配列 (Gibbsら (1995) Appl. Environ. Microbiology, 61 (12):4403-4408) を発現させるために、オリゴヌクレオチドプライマーを合成してポリメラーゼ連鎖反応に使用し、XynA遺伝子の全コード領域を増幅することができる。2つのプライマー、5'-ATGGTACCCATGCTAACCAAGGTTTCTATC (下線の配列は開始ATGを示す) (T7プロモーターにクローニングするために、5'末端にNcoI部位を含有する)、及び5'-CCTATAGGCGCGCCAAACTTTACAATCTCCC (クローニングのために、5'末端にAscI部位を含有する) を使用してXynA配列の全コード領域を増幅することができる。次いで1300塩基対の増幅産物をT7プロモーター発現カセットpCGN5063にクローニングして構

築物pCGN6581を作製することができる。このプラスミドは、XynAコード配列の成熟タンパク質部分及びpsbA転写終結領域に機能的に連結したT7バクテリオファージプロモーターの色素体発現調節要素を含有する。キメラのキシラナーゼ発現カセットをHindIIIからNotIのDNA断片として切り出し、タバコ葉緑体相同ベクターpCGN6043の同じ制限部位にクローニングして色素体形質転換構築物pCGN6582を作製することができる。

#### 【0063】

トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 由来のCBH1をコードする核酸配列を発現させるために (Shoemakerら, (1983) Biotechnology, 1:691-696) 、オリゴヌクレオチドプライマーを合成してポリメラーゼ連鎖反応に使用し、CBH1遺伝子の全コード領域を増幅することができる。2つのプライマー、5' -TG GCACCATGCATCGGAAGTTGGCCGTCA (下線の配列は開始A T Gを示す) (T7プロモーターにクローニングするために、5'末端にNcoI部位を含有する) 、及び5' -C CTATAGGCGGCCAGGCACTGAGAGTAGTAAGG (クローニングのために、5'末端にAscl部位を含有する) を使用してCBH1配列の全コード領域を増幅することができる。次いで約1700塩基対の増幅産物をT7プロモーター発現カセットpCGN5063にクローニングして構築物pCGN6583を作製することができる。このプラスミドは、CBH1コード配列の成熟タンパク質部分及びpsbA転写終結領域に機能的に連結したT7バクテリオファージプロモーターの色素体発現調節エレメントを含有する。キメラのCBH1発現カセットをHindIIIからNotIのDNA断片として切り出し、タバコ葉緑体相同ベクターpCGN6043の同じ制限部位にクローニングして色素体形質転換構築物pCGN6584を作製することができる。

#### 【0064】

アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) 由来のラッカーゼIをコードする核酸配列 (Aramayoら(1990) Nucleic Acids Research, 18 (11):3415) を発現させるために、オリゴヌクレオチドプライマーを合成してポリメラーゼ連鎖反応に使用し、y A遺伝子の全コード領域を増幅することができる。2つのプライマー、5' -ATCCAGCCATGCACCTCTCCACGGTCCTCTTCCA (下線の配列は開始A TGを示す) (T7プロモーターにクローニングするために、5'末端にNcoI部位

を含有する)、及び5' -TATGAGGGCCGCCCTAACAAATCCAAACATCAACCCCCG (クローニングのために、5' 末端にA s c I 部位を含有する) を使用してy A配列の全コード領域を増幅することができる。次いで約2100塩基対の増幅産物をT7プロモーター発現カセットpCGN 5063にクローニングして構築物pCGN 6585を作製することができる。このプラスミドは、yAコード配列の成熟タンパク質部分及びpsbA転写終結領域に機能的に連結したT7バクテリオファージプロモーターの色素体発現調節エレメントを含有する。キメラのラッカーゼ発現カセットを HindIIIからNotIのDNA断片として切り出し、タバコ葉緑体相同ベクターpCGN 6043の同じ制限部位にクローニングして色素体形質転換構築物pCGN 6586を作製することができる。

#### 【0065】

##### (実施例2) 植物色素体の形質転換

核ゲノムからT7ポリメラーゼを発現させるために形質転換された、植物色素体をターゲッティングするタバコ植物を、McBrideらの米国特許第5,576,198号に記載されるようにして得た。色素体ターゲッティングT7ポリメラーゼに関してホモ接合性であるトランスジェニックタバコ植物を、粒子衝撃 (particle bombardment) を使用した色素体の形質転換に使用する。

#### 【0066】

タバコ色素体をマイクロプロジェクタイルの粒子銃送達 (particle gun delivery of microprojectiles) で形質転換する。色素体ゲノムへの組込みはホモ接合性組換えによって起こり、標的部位はアセチルCoAカルボキシラーゼとRuBisCo (rbcL) の大型サブユニットの間であるので、色素体ゲノムにつき1個のトランスジーンのコピーが見込まれる (Svabら(1993), 上記)。

#### 【0067】

pCGN 4026 (McBrideら, 米国特許第5,576,198号) T-DNAに関してホモ接合性であるタバコ種子 (*N. tabacum* v. Xanthi N/C) を50%クロロツクス溶液 (2.5%次亜塩素酸ナトリウム) 中で20分間、表面滅菌し、無菌H<sub>2</sub>Oで4回すすぐ。次いで種子を0.2X MS培地上に許容できるように(asceptically)に播種して発芽させた。苗を、30g/1のスクロースを含有する固形寒天MS培地

上で生長させる (MurashigeおよびSkoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:493-497)

。

### 【0068】

タンクスティンマイクロプロジェクタイル ( $1.0 \mu\text{m}$ ) をDNA (例えばT7/E 1セルラーゼ発現構築物、pCGN 6 1 1 5) でコーティングし、コーティングしたマイクロプロジェクタイルを使用して、背軸側を上にしてRMOP培地 (MS塩、 $1\text{mg}/1$  BAP、 $0.1\text{mg}/1$  NAA、 $3.0\text{g}/1$  スクロース、及び $0.7\%$  植物寒天 (phytager) ) (Svabら (1990), 上記) 上に置いた成熟した葉にBio-Rad PDS 1000/He衝撃システムを使用して撃ち込んだ (Sanfordら (1991) *Technique* 3:3-16 ; Kleinら (1992) *Bio/Technology* 10:286-291)。 $5.0\text{mg}/1$  の塩酸スペクチノマイシンを補足したRMOP培地上の形質転換した植物の生育、およびその後の同じ選択培地上でのサブクローニングをSvabら (1990) (Svab及びMalgia (1993) ; 上記) に従って実施する。選択した植物を、 $1\text{mg}/1$  IBA、 $5.0\text{mg}/1$  二塩酸スペクチノマイシン、及び $0.6\%$  植物寒天を含有するMS培地に根付かせる。

### 【0069】

#### (実施例3) 色素体におけるセルラーゼ発現の分析

上記の色素体の形質転換に続いて、バックグラウンドを生じる核コード化T7RN Aポリメラーゼで生産される5個の独立して単離したホモプラスミー系を作製した。pCGN 6 1 1 5構築物の図及びタバコ色素体ゲノムへの組込みの説明を図1に示す。上段はpCGN 6 1 1 5から与えられた新来のDNAを示し、中段は組込み標的領域を示す。XbaI断片の予想されるサイズを新来のDNA並びに野生型DNAについて示す。新来DNAの5'末端にXbaI部位が存在しないので、2つのキメラ遺伝子を合わせたサイズを示す。また、サザン分析に使用されるプローブの位置も図1に示す。図2に示すように、ホモプラスミーをサザンプロット分析で測定した。

### 【0070】

サザン・ハイブリダイゼーションによってホモプラスミーを確認するために、総植物細胞DNAをBernatzkyおよびTanksleyが記載するように調製する ((1986) *Theor Appl Genet.* 72:314-321)。それぞれのサンプルについて約 $3\mu\text{g}$ のDNAを

*Xba*Iで消化し、0.7%アガロースで電気泳動し、Nytran+に転移した(SchleicherおよびSchuell)。フィルターをバッファー(50% ホルムアミド、6x SSC、5x Denhard溶液、0.5% SDS、150 μg/ml サケ精子DNA)中、42°Cで $\alpha^{32}$ P-dCTP標識したプローブとハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションプローブを組込み領域にわたる核酸配列から調製した。このDNA配列は約50%の天然の葉緑体遺伝子アセチルCoAカルボキシラーゼといくつかの隣接する組込み配列を含有し、*Not*I/*Xho*I断片としてpCCN6042(プラスミドpCGN6115に存在するタバコ色素体相同配列のみを含有する前駆プラスミド)から誘導される。

### 【0071】

サザンハイブリダイゼーションの結果を図2に示す。E1セルラーゼ及びaadAコード配列を含有するホモプラスミー系を同定する。6042DNA断片でプローブした形質転換していない対照のタバコ系(野生型Xanthi)は1.5kbのDNA断片とハイブリダイズし、他方、E1セルラーゼおよびaadA配列を含有するホモプラスミータバコ系は2.5kbのDNA断片とハイブリダイズする。ホモプラスミーであるトランスペラストム系は野生型DNA断片(1.5kb)及びホモプラスミDNA断片(2.5kb)の両方を含むハイブリダイゼーションパターンを示す。トランスジェニック植物と野生型の間のバンドサイズの相違は、トランスジェニック植物におけるaadA耐性遺伝子およびその調節配列の存在である。これにより、約1kbが野生型のバンドに付加される。

### 【0072】

ホモプラスミー6115タバコ系がE1 β-1, 4-エンドグルカナーゼを発現することを証明するために、ウェスタンプロット分析を、総可溶性葉タンパク質を使用して実施した。葉タンパク質を以下のように抽出した：200mgの成熟した葉サンプルを液体N2中で凍結させ、0.08mlの抽出バッファー(0.1M NaPO4 pH 6.8、0.15M NaCl、0.01M EDTA、0.01M DTT、0.01M チオ尿素、0.3% Tween-20、0.05% トリトン-X100を含有)中で粉碎した。タンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した。タンパク質サンプルを等量の2x Laemmliサンプルバッファー(Laemmli (1970) Nature 227

:680-685) といっしょにして、煮沸した後、10%Laemmliゲルに加えた。1レーンにつき約40μgの総葉タンパク質を加えた。

#### 【0073】

アシドサーマスのE1セルラーゼに対して生成したモノクローナル抗体を使用したウェスタンプロット分析の結果(図3)は、E1タンパク質が試験した全てのホモプラスミー6115系で発現することを示している。ストレプトミセス(Streptomyces)から精製したE1セルラーゼ 250ngを第1のレーンに加えた。このタンパク質は変性ゲル上で複数の型として移動させ、最も高い型は72,000の分子量であり、分泌のためのシグナルペプチドを含有する。成熟型の酵素は約60kdである。第2のレーンは対照のタバコ組織を含有する。第3のレーンは6115ホモプラスミー植物からの抽出物を含有するが、これは色素体においてE1 セルラーゼの発現を活性化するT7 RNAポリメラーゼを含有しない。レーン4-8は4026Xanthiバックグラウンドにおける独立した6115ホモプラスミー系である。4026構築物は、色素体でE1セルラーゼの発現を活性化する色素体にターゲッティングされたT7 RNAポリメラーゼを発現する。60kdの主たるタンパク質バンドは成熟E1セルラーゼである。レーン9はE. coliから精製したE1セルラーゼの触媒型からセルロース結合ドメイン(CBD)を除去したもの(100ng)を示す。

#### 【0074】

組換えストレプトミセスから精製したアシドサーマスのE1セルラーゼを変性ゲル上で複数の型として移動させ、この形態として最も高い形態は72,000の分子量であり、細菌からの酵素の分泌に必要な内因性シグナルペプチドを含有する。成熟型の酵素は約60キロダルトンである。従って、図3から認められるように、E1セルラーゼは植物色素体中で60kdの成熟型として発現され、おそらくはin vivoにおけるタンパク分解プロセシングによって、40kdの触媒ドメイン型に変換されうる。更にまた、ウェスタンプロット分析の結果から、E1- $\beta$ -1, 4-エンドグルカナーゼのタンパク質発現は、トランスポラストムのタバコ系の葉において総可溶性植物タンパク質の約1%であると算定できる。

#### 【0075】

E1 セルラーゼを発現するホモプラスミー 6115 タバコ系からの粗製の総可溶性葉タンパク質を、セルラーゼ活性について更に分析した。アシドサーマスの E1 セルラーゼの  $V_{max}$  は最高で 80°C に近いので、実験は 55°C 及び 80°C で実施した。Laymonら ((1996) Applied Biochem. Biotechnol. 57/58:389-397) に記載されているように、タンパク抽出物 (約 12 μg 総葉タンパク質) を反応液中で試験して、フッ素生成基質 4-メチルウンベリフェリル-β-D-セロビオシド (MUC) の加水分解を測定した。結果を表 1 に示す。

【表 1】

系	55°Cで60分 pM Mu/μg/分	80°Cで60分 pM Mu/μg/分	80°Cでの上昇 (倍)
6115-7	392,063	2,432,540	6.20
6115-8	145,294	747,059	5.14
6115-10	39,706	222,549	5.60
6115-11	88,596	574,561	6.49
Xanthi(対照)	n / a	13,636	n / a

## 【0076】

上記の結果は、植物色素体で発現されたセルラーゼが 80°C でより高レベルの活性を有することを明示している。粗抽出物を MUC と共に 80°C でインキュベートした場合、55°C でインキュベートして得られたセルラーゼ活性に比較して酵素活性が 5 から 6 倍に上昇する。従って、植物色素体で発現されたセルラーゼはアシドサーマス・セルロリティカス (*cellulolyticus*) から単離された野生型酵素と同様の反応速度特性を示す。

## 【0077】

本明細書で言及した全ての文献及び特許出願は、本発明の属する技術分野の当業者の技術レベルを示すものである。全ての文献及び特許出願は、それぞれの文献または特許出願が参照により明確かつ個別に明細書の一部として組み入れられたのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0078】

上述の発明は理解を明白にする目的で例証及び実施例として詳細に記載したものであるが、添付の請求の範囲内で一定の変更及び修正を実施してもよいことは

明らかである。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

植物色素体の形質転換のための主要なDNAベクターpCGN6115の概要図を示す。図1は色素体ゲノム中の相同的組換え部位の概要図も示す。上段はE1セラーゼをコードするトランスジーン、色素体形質転換体を選択するためのaadA (Strep/spec) マーカー遺伝子、及び色素体相同配列を表す。中段はトランスジーンが組み込まれる葉緑体ゲノムの領域を示し、下段は色素体形質転換体の測定の為のサザンハイブリダイゼーションに用いる核酸プローブを表す。

#### 【図2】

図示したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。野生型のバンドはレーン1である。プラスミド(pCGN6115)対照はレーン3である。同じトランスジェニック事象のいくつかのサブクローニングを同じプロットで解析した。個々のサブクローニングを同一の開始形質転換体から再生した。例えば、事象6115～14では、同じ事象の4つのサブクローニングがあるが、挿入された遺伝子に関して全てがホモプラスミーである。他の事象においては、いくつかのサブクローニングは野生型である。

#### 【図3】

図3は精製したアシドサーマス・セルロリティカスE1 $\beta$ -1, 4-エンドグルカナーゼに対するモノクローナル抗体を用いたpCGNpCGN6115で形質転換したホモプラスミータバコ系から抽出された総可溶性葉タンパク質のウエスタンハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図1】

## pCGN6115 のプラスミドマップ

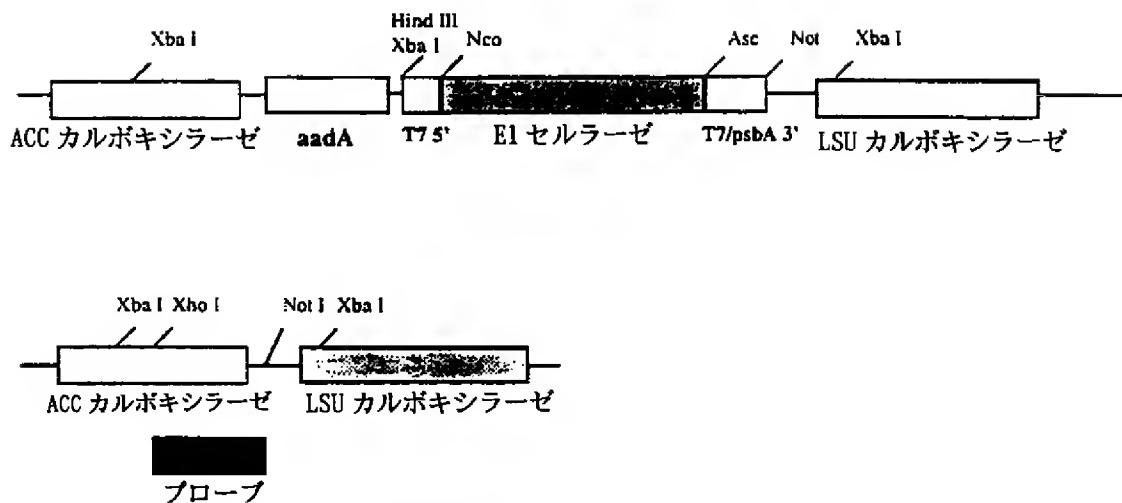


Figure 1

【図2】

## タバコにおける pCGN6115 に関する葉緑体のサザンプロット

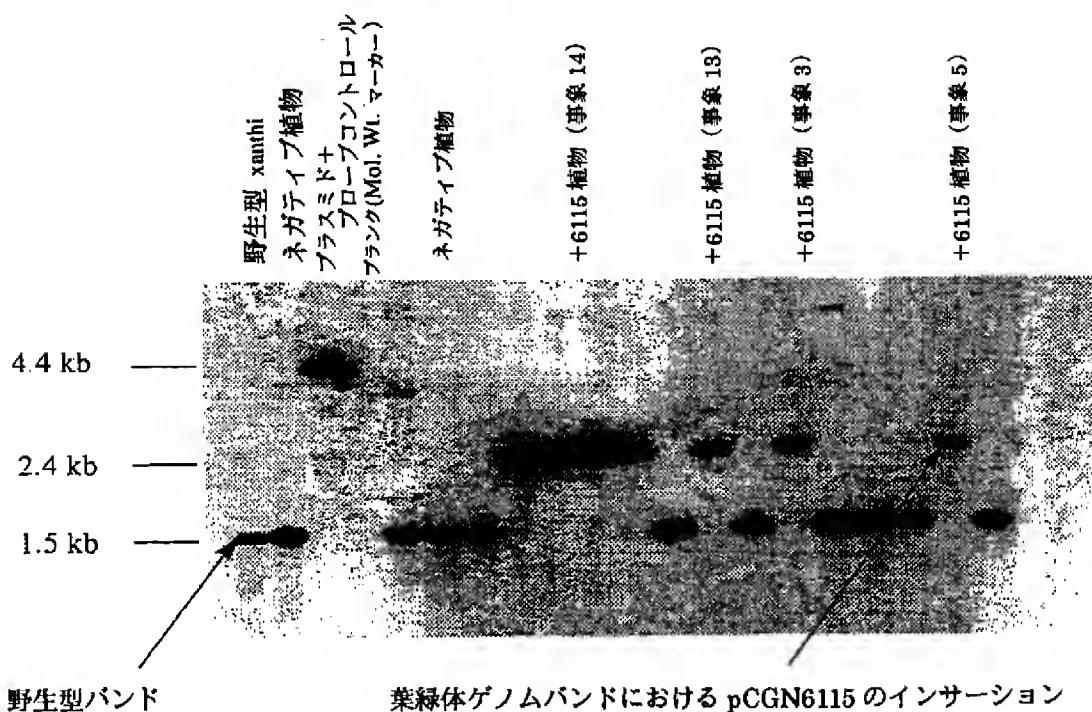


Figure 2

【図3】

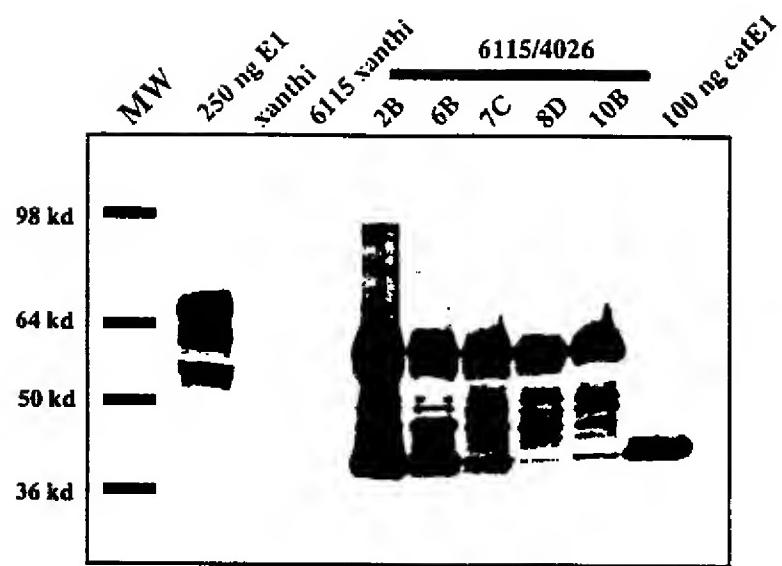


Figure 3

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

						Int'l Application No PCT/US 99/16579												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/53 C12N15/55 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 A01H5/10																		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A01H																		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)																		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">HERBERS K. ET AL.: "Apolyplastic expression of the xylanase and beta (1-3,1-4) glucanase domains of the xynD gene from Ruminococcus flavefaciens leads to functional polypeptides in transgenic tobacco plants" MOLECULAR BREEDING, vol. 2, 1996, pages 81-87, XP002130591 the whole document</td> <td style="padding: 2px;">1,7,10, 11,13,14</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">LIU J. ET AL.: "Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus Neocallimastix patriciarum" MOLECULAR BREEDING, vol. 3, 1997, pages 463-470, XP002130592 the whole document</td> <td style="padding: 2px;">1,3,7, 10,11, 13,14, 29,32, 33,35</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">---</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>							Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No	X	HERBERS K. ET AL.: "Apolyplastic expression of the xylanase and beta (1-3,1-4) glucanase domains of the xynD gene from Ruminococcus flavefaciens leads to functional polypeptides in transgenic tobacco plants" MOLECULAR BREEDING, vol. 2, 1996, pages 81-87, XP002130591 the whole document	1,7,10, 11,13,14	X	LIU J. ET AL.: "Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus Neocallimastix patriciarum" MOLECULAR BREEDING, vol. 3, 1997, pages 463-470, XP002130592 the whole document	1,3,7, 10,11, 13,14, 29,32, 33,35		---	-/-
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No																
X	HERBERS K. ET AL.: "Apolyplastic expression of the xylanase and beta (1-3,1-4) glucanase domains of the xynD gene from Ruminococcus flavefaciens leads to functional polypeptides in transgenic tobacco plants" MOLECULAR BREEDING, vol. 2, 1996, pages 81-87, XP002130591 the whole document	1,7,10, 11,13,14																
X	LIU J. ET AL.: "Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus Neocallimastix patriciarum" MOLECULAR BREEDING, vol. 3, 1997, pages 463-470, XP002130592 the whole document	1,3,7, 10,11, 13,14, 29,32, 33,35																
	---	-/-																
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.														
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																		
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report														
16 February 2000				06.03.00														
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.O. Box 5018 Patentkantoor 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer  Kania, T														

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte  
lational Application No  
PCT/US 99/16579

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CA 2 190 194 A (MOLONEY MAURICE M ;LIU JIN HAO (CA); CHENG KUO JOAN (CA); FORSBERG) 13 May 1998 (1998-05-13)  see esp. example C ---	1,3,7, 10,11, 13,14, 29,32, 33,35
X	HERBERS K ET AL: "A THERMOSTABLE XYLANASE FROM CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM EXPRESSED AT HIGH LEVELS IN THE APOPLAST OF TRANSGENIC TOBACCO HAS NO DETRIMENTAL EFFECTS AND IS EASILY PURIFIED" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 13, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 63-66, XP002008876 ISSN: 0733-222X the whole document	1,6,7, 10,11, 13-18, 23-26
Y		2-5,9, 12, 19-23, 28-35,37
X	WO 97 45549 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;FAYE LOIC (FR); GOHARD VERONIQUE MARTINE () 4 December 1997 (1997-12-04) ---	1,7,10, 11,13, 14, 16-18, 24,26
Y	the whole document	2-5,12, 19-23, 29-33,35
X	WO 98 11235 A (CIBA GEIGY AG ;HEIFETZ PETER (US); LEBEL EDOUARD (US); UKNES SCOTT) 19 March 1998 (1998-03-19) see the whole document; esp. examples B, C ---	1-37
Y		2-5,9, 19-22, 28-37
X	WO 98 16651 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 23 April 1998 (1998-04-23) the whole document	1,6-8, 10-18, 23-27 2-5,9, 19-22, 28-37
X	OHMIYA, KUNIO ET AL: "Relaxation of biomass tissue by expressing bacterial genes encoding xylyanases and cellulases" BIOTECHNOL. SUSTAINABLE UTIL. BIOL. RESOUR. TROP. (1997), 11, 24-33, XP002118613 see the whole document; esp. pp.28-31 ---	1-3,6-8, 10,11, 13-19, 23,24,27
		-/-

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) [July 1992]

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 99/16579

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 02551 A (MIDWEST RESEARCH INST) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application the whole document ---	1-37
A	SHOEMAKER ET AL.: BIOTECHNOLOGY, vol. 1, 1983, pages 691-696, XP000653365 cited in the application the whole document -----	9,28,37

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

In. national application No. PCT/US 99/16579
---

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-7,9-26,28-35,37 partially; 8,27,36 completely

A construct comprising a promoter functional in a plant cell, a DNA sequence encoding a polysaccharide hydrolyzing enzyme and a transcription termination region. Said construct optionally comprising: a promoter being functional in a plant plastid, a targeting sequence for directing transport to a cellular organelle, preferably to vacuoles and plastids. Said enzyme optionally being active at or above temperatures of 45AC, 55AC, 80AC, being a cellulase (endo- or exo-) or cellobiohydrolase, preferably being a CBH1 enzyme. Plant cells, plants, and seeds comprising said constructs. Use of said constructs in methods for: the production of polysaccharide hydrolyzing enzymes, preferably heat optimal industrial enzymes degrading cell walls in plants, methods for altering cellulose content in plant tissue, methods for encapsulating an enzyme that degrades a cell wall component in a plant cell organelle.

2. Claims: 1-7,9-26,28-35,37 partially

idem, the enzyme being a hemicellulase, preferably a xylanase, more preferably a xynA enzyme

3. Claims: 1-7,9-26,28-35,37 partially

idem, the enzyme being a ligninase or laccase, preferably being selected from the group of lacAL, lccI, and lccIV.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 99/16579

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
CA 2190194	A	13-05-1998	NONE		
WO 9745549	A	04-12-1997	FR AU	2749322 A 3097297 A	05-12-1997 05-01-1998
WO 9811235	A	19-03-1998	AU CN EP PL	4414697 A 1230224 A 0925362 A 331767 A	02-04-1998 29-09-1999 30-06-1999 02-08-1999
WO 9816651	A	23-04-1998	US AU BR EP	5981835 A 4980797 A 9712538 A 0932692 A	09-11-1999 11-05-1998 19-10-1999 04-08-1999
WO 9602551	A	01-02-1996	US AU AU CA EP US	5536655 A 682125 B 3098595 A 2194478 A 0771321 A 5712142 A	16-07-1996 18-09-1997 16-02-1996 01-02-1996 07-05-1997 27-01-1998

---

フロントページの続き

(72)発明者 シャーフ, デヴィッド, ジェイ.  
アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア  
州, デーヴィス, ブレントウッド プレイ  
ス 2780

(72)発明者 トーマス, スティーブン, アール.  
アメリカ合衆国 80220 コロラド州, デ  
ンヴナー, カーニー ストリート 485

Fターム(参考) 2B030 AD08 CA15 CA17 CA19  
4B024 AA03 AA05 AA10 BA12 CA04  
DA01 DA05 EA04 FA02 FA20  
GA11 HA01  
4B050 CC03 DD02 DD03 LL02 LL04  
4B065 AA01Y AA57Y AA88X AB01  
BA01 CA31 CA41 CA57 CA60